

製品データ:129

Zenon™ Mouse IgG Labeling Kits を用いた脳虚血モデルにおけるモノクローナル抗体による 神経細胞とアストロサイトの 2 重染色

2004 年 6 月

データの提供: 船越 洋 先生、中平 理恵 先生、中村 敏一 先生
大阪大学大学院医学系研究科組織再生医学講座分子組織再生分野

[目的]

神経系の変性・再生機構の解明のための神経細胞とグリア細胞の同時可視化等、複数のマーカーを同一視野で可視化する必要性は様々な状況で生じる。特に異種の抗体を用いた 2 重染色ができない場合、これまでは隣接切片での解析を行うか、複数の 1 次抗体を時間をかけて蛍光ラベルし、その後精製してから用い 2 重染色する必要があった。今回抗体の特異性がはっきりしている神経特異的抗体であるマウス MAP2 (microtubule-associated protein 2) モノクローナル抗体とアストロサイト特異的抗体であるマウス GFAP (glial-fibrillary acidic protein) モノクローナル抗体を Zenon™ kit を使うことでそれぞれ別の蛍光標識を 10 分程度で行い 2 重染色に用いてその有用性を検証した。4-vessel occlusion model (4-vo) により脳虚血モデルを作成し、生存神経細胞と反応性アストロサイトを、Zenon™ システムを用いることで評価した。

[方法]

4-vessel occlusion model (4-vo) モデルと切片の作成:

イソフルラン／笑気／酸素麻酔下に、成体ラットの両側椎骨動脈を切断し、翌日総頸動脈を 5 分間結紮した。1 週間後動物を PBS、続いて 4% PFA で還流後、脳組織を取り出し 4℃ で 10% sucrose/PBS、つづいて 20% sucrose/PBS に浸潤後凍結切片を作成した。

ブロッキング: 切片を 10% goat 血清／0.3% Triton X-100／PBS 溶液で室温 30 分間インキュベートしブロッキングを行った。ブロッキング中に以下の方法で 1 次抗体の蛍光標識を Zenon™ Kit を用い行った。

[Zenon™ Mouse IgG kit を用いたマウスモノクローナル抗体の蛍光標識]

神経特異的マウスモノクローナル抗体 (MAP2) の Alexa Fluor® 546 による標識:

まず mouse monoclonal MAP2 IgG 1 µg を 20 µl PBS に溶解した物を作成し、そこに 5 µl の Zenon™ mouse IgG1 labeling reagent (Alexa Fluor® 546) を遮光下 5 分間室温にてインキュベートする。そこに Zenon™ blocking reagent を添加し遮光下室温で 5 分間インキュベートを 4℃ で保管する。

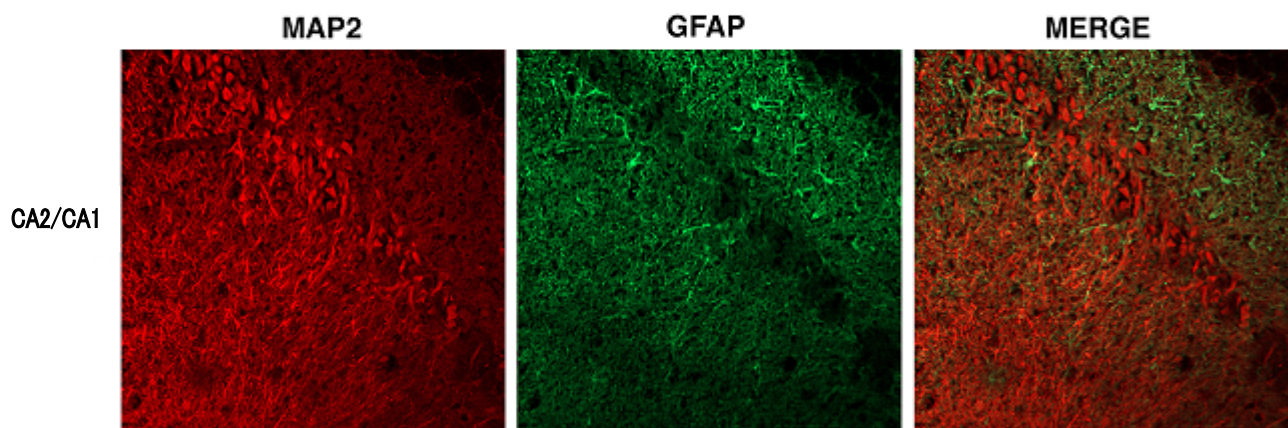
アストロサイト特異的マウスモノクローナル抗体 (GFAP) の Alexa Fluor® 488 による標識: まず mouse monoclonal GFAP IgG 1 µg を 20 µl PBS に溶解した物を作成し、そこに 5 µl の Zenon™ mouse IgG1 labeling reagent (Alexa 488) を遮光下 5 分間室温にてインキュベートする。そこに Zenon™ blocking reagent を添加し遮光下室温で 5 分間インキュベートを 4℃ で保管する。

[抗体反応]

ブロッキング溶液で最終濃度 1 µg/ml になるように上記作成した蛍光標識 MAP2 抗体と蛍光標識 GFAP 抗体溶液を混合したものを作成し、ブロッキングを終了した切片に加え遮光下室温で 2 時間インキュベートした。PBS で 5 分ずつ 3 回 wash 後、PBS／Tween で 2 回洗浄後、4% PFA／PBS で 15 分後固定してから封入し、ZEISS CONFOCAL 顕微鏡 (LSM5) で観察した。励起波長/検出波長: Alexa Fluor® 488: ex citation 488 nm, emission BP: 505-530 nm

Alexa Fluor® 546: ex citation 543 nm, emission BP: 560-615 nm

MAP2/GFAP IMMUNOSTAINING IN HIPPOCAMPUS AFTER 4-VO BY USAGE OF ZENON SYSTEM



【 結果 】

神経細胞とアストロサイトが共に特異的に赤と緑で染色された。4-vo による脳虚血により MAP2 抗体で染色される海馬の CA1 領域の神経細胞数が大幅に減少していることが確認された。一方緑色に GFAP 抗体で染色される反応性アストロサイトが神経細胞死領域の周囲で増加していることが確認された。

【 結論 】

Zenon™ Kitによる1次抗体の蛍光標識法は、従来法と比べて同種(マウス)のモノクローナル抗体を2種類使った2重染色において低バックグラウンドであること、及び短時間で操作ができ非常に有効であった。MAP2とGFAPの2重染色はマウスとラビットの抗体で2重染色可能であるが、私達はこのシステムを他のモノクローナル抗体の2重染色に適用しよい結果を得ている。2つの同種抗体を用いた2重染色に今後利用価値の高い蛍光標識キットといえる。

製品情報

製 品 名	製品番号	サイズ
Zenon™ Alexa Fluor® 546 Mouse IgG1 Labeling Kit *50 labelings*	Z-25004	1 kit
Zenon. Alexa Fluor 488 Mouse IgG1 Labeling Kit *50 labelings*	Z-25002	1 kit

価格については、ウェブをご覧ください。

研究用에만使用できます。診断目的およびその手続き上での使用は出来ません。

記載の社名および製品名は、弊社または各社の商標または登録商標です。

標準販売条件はこちらをご覧ください。 www.lifetechnologies.com/TC

The trademarks mentioned herein are the property of Life Technologies Corporation or their respective owners.

© 2012, Life Technologies Japan Ltd. All rights reserved. Printed in Japan.

ライフテクノロジーズジャパン株式会社

本社：〒108-0023 東京都港区芝浦 4-2-8

TEL.03 (6832) 9300 FAX. 03 (6832) 9580

www.lifetechnologies.com

大阪：〒564-0052 大阪府吹田市広芝町 10-28

TEL.06 (6339) 8165 FAX. 06 (6339) 8138

life
technologies™